

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-037465

(43)Date of publication of application : 13.02.2001

(51)Int.Cl.

C12N 1/00

A62D 3/00

C12N 1/14

C12N 9/02

(21)Application number : 11-211651

(71)Applicant : MERCIAN CORP

(22)Date of filing : 27.07.1999

(72)Inventor : FURUSAKI SHINTARO
GOTO MASAHIRO
WARIISHI HIROYUKI

(54) BIODEGRADATION OF DIOXIN USING LACCASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for easily biodegrading dioxins in incinerated ash or contaminated soil.

SOLUTION: This method for biodegrading dioxins comprises combined use of a laccase-contg. matter with a composition containing a laccase mediator such as 1-hydroxybenzotriazole, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid or 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-37465

(P2001-37465A)

(43) 公開日 平成13年2月13日 (2001.2.13)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード [*] (参考)
C 1 2 N 1/00		C 1 2 N 1/00	R 2 E 1 9 1
A 6 2 D 3/00	Z A B	A 6 2 D 3/00	Z A B 4 B 0 5 0
C 1 2 N 1/14		C 1 2 N 1/14	G 4 B 0 6 5
9/02		9/02	

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平11-211651	(71) 出願人	000001915 メルシャン株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
(22) 出願日	平成11年7月27日 (1999.7.27)	(72) 発明者	古崎 新太郎 神奈川県藤沢市大堀1-7-7
		(72) 発明者	後藤 雅宏 福岡県福岡市西区生松台2-41-5
		(72) 発明者	割石 博之 福岡県福岡市東区香椎6-13-33
		Fターム (参考)	2E191 BA12 BD20 4B050 CC07 KK10 KK11 LL05 LL10 4B065 AA71X AC14 CA28 CA58 CA60

(54) 【発明の名称】 ラッカーゼを用いるダイオキシン分解方法

(57) 【要約】

【課題】 焼却灰や汚染土壤中のダイオキシンを簡便に分解する方法を提供する。

【解決手段】 ラッカーゼ含有物と、ラッカーゼ・メディエーター、例えば1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、2,2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸、1-ニトロソ-2-ナフトール-3,6-ジスルホン酸を含有する組成物とを併用することを特徴とするダイオキシン分解方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラッカーゼ含有物と、ラッカーゼ・メディエーターを含有する組成物とを併用することを特徴とするダイオキシン分解方法。

【請求項2】 前記ラッカーゼ・メディエーターが、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、2, 2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸および1-ニトロソ-2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸から選ばれる少なくとも1種である請求項1記載のダイオキシン分解方法。

【請求項3】 前記ラッカーゼ含有物が、ラッカーゼ産生菌の培養物またはその処理物である請求項1記載のダイオキシン分解方法。

【請求項4】 前記ラッカーゼ産生菌が、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*)、カワラタケ (*Coriolus versicolor*)、ヒイロタケ (*Pycnoporus coccineus*)、ヒラタケ (*Pleurotus octreatus*)、ベッコウタケ (*Fomitella fraxinea*) から選ばれる少なくとも1種である請求項1または3記載のダイオキシン分解方法。

【請求項5】 ラッカーゼと、ラッカーゼ・メディエーターとを含むことを特徴とするダイオキシン分解剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は微生物あるいはそれらが生産する酵素等の生体触媒を用いるダイオキシンの分解方法及びダイオキシン分解剤に関する。さらに詳しく言えば、ラッカーゼ(ｐ-ジフェノール酸化酵素)と、ラッカーゼの作用を増強する低分子化合物(ラッカーゼ・メディエーター)とを併用するダイオキシンの分解方法およびダイオキシン分解剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 ダイオキシン類は、奇形、ガン、免疫不全、内分泌障害などを引き起こすといわれ、人体に与える影響が懸念されている。人類が作り出した化学物質の中で、最も毒性が高いといわれ、農薬合成反応、産業及び家庭廃棄物の焼却などによって生成され、大気や土壌環境を広く汚染している。これらは化学的に安定で、脂溶性のため、食物連鎖によって、食品を経由して、人に取り込まれ、人体への蓄積が社会問題となっている。

【0003】 したがって、環境保護などの点からも、これらの化合物を分解する方法を確立することが重要である。ダイオキシン類の分解処理方法として、燃焼法、光分解法、アルカリ処理、オゾン分解、超臨界処理などの物理化学的処理法が実施又は検討されている。しかし環境中に放出されたダイオキシン類を効率的に処理するために十分でないので、最近では微生物あるいはそれらが生産する酵素を用いたダイオキシン類の分解が試みられている。

【0004】 このような酵素の中で、リグニンペルオキ

シダーゼのみがダイオキシン分解と関連しているとされ、ラッカーゼについては、ダイオキシンを分解できないと報告されている (Chemosphere, 12, 945-950(1983), 紙バ技協誌, 51, 1759-1768(1997), 第41回リグニン討論会講演要旨集, 163-164(1996))。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の課題は、微生物あるいはそれらが生産する酵素を用いたダイオキシン類を効率よく分解処理できる、実用化に向けたダイオキシンの分解方法及び分解処理剤を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決すべく、各種酵素を用い、各種の条件下でダイオキシン類の分解活性について検討したところ、従来ダイオキシン類の分解活性がないとされていたラッカーゼと、ラッカーゼ・メディエーターとを併用することにより、意外にも効率よくダイオキシン類を分解できることを見出し、本発明を完成した。

【0007】 すなわち、本発明は、以下のダイオキシン分解方法およびダイオキシン分解剤に関する。

1) ラッカーゼ含有物と、ラッカーゼ・メディエーターを含有する組成物とを併用することを特徴とするダイオキシン分解方法。

2) 前記ラッカーゼ・メディエーターが、ヒドロキシベンゾトリアゾール、2, 2'-アジノービス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸および1-ニトロソ-2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸から選ばれる少なくとも1種である前記1) 記載のダイオキシン分解方法。

3) 前記ラッカーゼ含有物が、ラッカーゼ産生菌の培養物またはその処理物である前記1) 記載のダイオキシン分解方法。

4) 前記ラッカーゼ産生菌が、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*)、カワラタケ (*Coriolus versicolor*)、ヒイロタケ (*Pycnoporus coccineus*)、ヒラタケ (*Pleurotus octreatus*)、ベッコウタケ (*Fomitella fraxinea*) から選ばれる少なくとも1種である前記1) または3) 記載のダイオキシン分解方法。

5) ラッカーゼと、ラッカーゼ・メディエーターとを含むことを特徴とするダイオキシン分解剤。

【0008】 以下、本発明のダイオキシン分解方法およびダイオキシン分解剤について詳しく説明する。

(1) ラッカーゼ

本発明に用いられるラッカーゼは、どのような由来のものでもよいが、好ましくは微生物由来のものである。ラッカーゼを産生する微生物の具体例としては担子菌 (*Basidiomycetes*) (木材腐朽菌類等、中でも白色腐朽菌等) 等が挙げられる。例えば、スエヒロタケ (*Schizophyllum commune*)、カワラタケ (*Coriolus versicolor*)

r)、ヒイロタケ (*Pycnoporus coccineus*)、ヒラタケ (*Pleurotus octreatus*)、ベッコウタケ (*Fomitella fraxinea*) 等が挙げられる。これらの中でも、好ましいのはヒイロタケ、カワラタケである。また、ラッカーゼを産生するように遺伝子を構築された菌であってもよい。これらの菌を1種または2種以上使用してもよい。本発明においてはラッカーゼ含有物としては、前記の微生物から調製される培養物（微生物自体を含む培養液または微生物を遠心処理などによって除いた培養物等）、その部分精製標品または完全精製標品を使用することができる。

【0009】(2) ラッカーゼ・メディエーター
本発明において、ラッカーゼと併用して用いられるラッカーゼ・メディエーターは、ラッカーゼの酵素反応を促進する性質をもつ物質をいうが、(1)低分子量、(2)水溶性、(3)電子移動性、(4)適度な酸化還元ポテンシャルを有する、(5)ラジカルを形成する、(6)ラッカーゼの基質である、などの性質を有するものが望ましい。具体的には、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (1-OH-Benzotriazole, HBTと略記する。)、2, 2'-アジノービス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphoniacid), ABTSと略記する。)、1-ニトロソ-2-ナフトール-3, 6-ジスルホン酸 (1-nitroso-2-naphthol-3, 6-disulfonic acid, NNSと略記する。)等を挙げるができる。

【0010】本発明で使用するラッカーゼ・メディエーターを含有する組成物は、ラッカーゼ・メディエーターを含有するものであればいかなるものでもよい。例えばラッカーゼ・メディエーターのジメチルホルムアミド溶液等が用いられる。

【0011】(3) 培養条件

本発明において使用するラッカーゼ産生菌の培養は好氣的または嫌氣的条件、好ましくは好氣的条件下で行なう。好気培養は、通常の中温菌の培養に準じ、振盪培養により行なえばよい。培養液のpHは3~8であり、さらに好ましくは6~8である。培養温度は10~45℃、好ましくは25~30℃である。培養を継続する時間は、目的とするラッカーゼが十分量産生できる時間である。微生物の種類にもよるが、通常は1~10日間、好ましくは3~5日程度である。

【0012】培地は、通常の微生物、特に菌類の培養に用いるものであれば特に制限されない。培地には、さらに必要に応じて各種の炭素源あるいは窒素源を添加する。炭素源としては、グルコース、フルクトース、マルトース、サッカロース、グルセリン、スターチ、糖蜜、廃糖蜜、マルツエキス等が挙げられる。窒素源としては、肉エキス、ペプトン、グルテンミール、大豆粉、乾燥酵母、酵母エキス、硫酸アンモニウム、酒石酸アンモニウム塩、尿素等が挙げられる。その他、必要に応じ

て、ナトリウム塩、マグネシウム塩、マンガン塩、鉄塩、カルシウム塩、リン酸塩等の無機塩類や、イノシトール、ビタミンB1塩酸塩、L-アスパラギン、ピオチン等のビタミン類を添加してもよい。

【0013】(4) ダイオキシン分解方法

本発明によるラッカーゼ含有物と、ラッカーゼ・メディエーターを含有する組成物とを併用するダイオキシンの分解方法においては、前記のラッカーゼ含有物と前記のラッカーゼ・メディエーター含有組成物を同時または順次に添加・混合し処理することにより行なわれる。例えば、前記含有物および組成物を焼却灰やダイオキシン汚染土壌等のダイオキシン含有物質に直接添加混合するか、逆にダイオキシン含有物質を含有物および組成物に添加し分解を行なう方法等が挙げられる。バッチ法、連続法、半連続法等のいずれをも用いることができる。さらに、本発明のダイオキシン分解方法には前記した処理の前後に、洗浄工程または抽出工程等の工程を設けることができる。

【0014】(5) ダイオキシン分解剤

本発明によるラッカーゼ含有物と、ラッカーゼ・メディエーターを含有する組成物とを含むダイオキシン分解剤は、液剤であると固型剤であるとを問わない。例えば、ダイオキシン分解活性を有する培養液自体、部分精製標品または精製標品に助剤を加えて製剤化したものがある。これらは1種または2種以上組み合わせて使用することができる。また、前記製造助剤を加えて固型剤としたものを、処理するダイオキシン含有物質自体にまたは処理媒体中に添加して使用することもできる。

【0015】

【実施例】以下、例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの例により限定されるものではない。以下の例中、%は特に記載がない限り重量%である。

【0016】実施例1

ダイオキシン (Dibenzo-p-dioxine) の500μMアセトニトリル溶液と、HBTの10mMジメチルホルムアミド溶液をそれぞれ調製した。ラッカーゼを20mMリン酸緩衝液 (pH3.0) に溶解した後、表1に示した実験条件に従い、前記のダイオキシン溶液、HBT溶液を所定量添加して反応を開始した。HPLC (分析条件は表2に示す) を用い、ダイオキシンの減少量を追跡した。結果を図1に示す。24時間反応した結果、15.2%のダイオキシンが減少していた。なお、図中のBTはベンゾトリアゾールの略記である。

【0017】

【表1】

表1 実験条件

Dibenzo- <i>p</i> -dioxine	100 μ M
HBT	100 μ M
20mM phosphate buffer	PH=3
laccase	3 μ M
Temperature	30 $^{\circ}$ C

【0018】

【表2】

表2 HPLC 分析条件

溶離液	A: 0.1%リン酸ナトリウム B: アセトニトリル
グラジエントプログラム	0min A:70%, B:30% 5min A:70%, B:30% 10min A:0%, B:100% 20min A:0%, B:100% 20.1min A:70%, B:30% 30min STOP
測定波長	288 nm

【0019】実施例2

実施例1の実験条件において、ラッカーゼ・メディエーターの種類を変え、ダイオキシンの分解量を調べた。ラッカーゼ・メディエーターとして、HBT、ABTS、ピオルリン酸(violuric acid, Vio)、NNS、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)を用いた。濃度は100 μ M、反応時間は24時間で実験した。結果を表3に示す。HBT、ABTSまたはNNSを併用するとラッカーゼは、ダイオキシンを分解することができた。

【0020】

【表3】

表3 実験結果

メディエーター	Degradation[%]
HBT	15.2
ABTS	1.20
Vio	0
NNS	0.38
3-HAA	0

【0021】実施例3

実施例1の実験条件において、HBT濃度を100~3000 μ Mに変化させ、ダイオキシンの分解量を調べた。反応時間は24時間で実験した。結果を図2に示す。HBTが200 μ Mのときに、最大の分解率37.8%を示した。

【0022】実施例4

実施例1の実験条件において、緩衝液のpHを3~7に変化させ、ダイオキシンの分解量を調べた。反応時間は24時間で実験した。結果を図3に示す。pHが3のときに、最大の分解率を示した。これはラッカーゼの至適pHと一致した。

【0023】

【発明の効果】本発明は、これまでダイオキシンを分解できないされていたラッカーゼを利用するダイオキシン分解方法及び分解剤を提供するものである。本発明のダイオキシン分解方法によれば、微生物が生産するラッカーゼおよびそのメディエーターを利用して焼却灰や汚染土壌中のダイオキシンを簡単に分解することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】ラッカーゼ・メディエーターとしてHBTを用いたダイオキシン分解反応の経時変化を示すグラフである。

【図2】ラッカーゼ・メディエーターとしてHBTを用いたダイオキシン分解反応のHBT濃度依存性を示すグラフである。

【図3】ラッカーゼ・メディエーターとしてHBTを用いたダイオキシン分解反応のpH依存性を示すグラフである。

【図1】

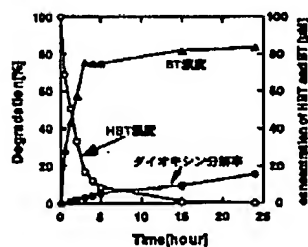


図1 反応の経時変化

【図2】

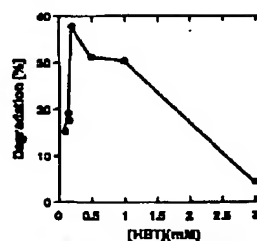


図2 HBT濃度依存性

【図3】

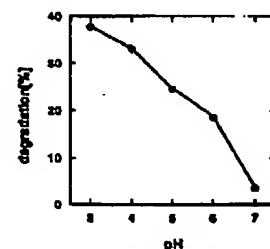


図3 pH依存性